



УДК 577.152.277 : 577.112.4

© 1990 г.

О. В. Морозова, Н. А. Белявская *, Е. Ф. Зайчиков **,
Э. А. Кветкова *, А. А. Мустаев **, А. Г. Плетнев

РЕПЛИКАТИВНЫЙ КОМПЛЕКС ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

I. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКА ЯДЕРНОЙ ФРАКЦИИ ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ИНИЦИАЦИЮ СИНТЕЗА РНК, С ПОМОЩЬЮ АФФИННОГО МЕЧЕНИЯ

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР;

* Омский институт природноочаговых инфекций МЗ РСФСР;

** Лимнологический институт СО АН СССР, Иркутск

Проведено субклеточное фракционирование клеток почки эмбриона свиньи, зараженных вирусом клещевого энцефалита (ТВЕ). Основная активность вирусной репликазы ассоциирована с фракцией ядер. Вирусный репликативный комплекс способен синтезировать полноразмерные вирусные РНК *in vitro*. С помощью метода аффинного мечения аналогами нуклеозид-5'-три(моно-, ди-)фосфатов проведено селективное мечение репликативного комплекса вируса в ядерной фракции клеток. Показано, что аффинному мечению подвергается полипептид с молекулярной массой около 69 кДа. Этот же белок выявляется методом иммуноблоттинга с помощью антител, специфичных к белкам вируса клещевого энцефалита. На основании полученных данных сделан вывод о том, что в инициации репликации вируса ТВЕ участвует неструктурный белок NS3, кодируемый вирусным геномом.

Вирусы семейства *Flaviviridae*, представителем которого является вирус ТВЕ, имеют геномную одноцепочечную РНК положительной полярности. Структура геномов ряда флавивирусов, в том числе ТВЕ, расширена [1—5]. Геномные РНК флавивирусов имеют капсированный 5'-конец (кэп I-типа), высокоструктурированные 5'- и 3'-концевые участки и не несут poly(A)-тракта на 3'-конце. В ходе развития флавивирусов в клетках наряду с 42S—44S геномной РНК обнаруживают ее промежуточные формы: репликативную двухцепочечную 20S—22S РНК (RF-форму), нечувствительную к действию рибонуклеазы, и гетерогенную 20S—28S РНК (RI-форму), подверженную частичному гидролизу нуклеазой [6—8]. Процесс взаимопревращений этих форм РНК можно представить схемой: 42S—44S РНК → RI → RF → 42S—44S РНК. Вирионная РНК — продукт интенсивного синтеза на матрице двухцепочечной РНК на поздних стадиях инфекции. Эта стадия инфекции характеризуется высоким уровнем активности репликативного комплекса флавивирусов, локализующегося в околоядерных мембранах [8]. Были предприняты попытки выделения репликативных комплексов из клеток, зараженных вирусами Каникин и Западный Нил [7—9]. Показано, что основная активность вирусной репликазы ассоциирована с ядрами клеток, а отделение вирусной репликазы от мембран ядер приводит к снижению уровня синтеза вирусных РНК. Частично очищенный репликативный комплекс вируса Западного Нила представляет собой сложный набор белковых компонентов вируса и клетки, поэтому установить роль индивидуальных вирусных белков в репликативном комплексе пока не удалось. Отделение неструктурного белка NS5 от фракции

Сокращения: ТВЕ — вирус клещевого энцефалита, SDS — додецилсульфат натрия, буфер SSC — буферный раствор: 0,3 М NaCl, 0,1 М цитрат натрия.

Рис. 1. Кинетические кривые включения $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ в кислотонерастворимый продукт. Синтез РНК *in vitro* проводили как описано в «Экспер. части». По оси абсцисс — время реакции, по оси ординат — включение меченого GMP в кислотонерастворимый продукт. Реакционные смеси содержали фракцию ядер (1), фракцию мембран (2), цитоплазматическую фракцию (3) из клеток СПЭВ, зараженных вирусом ТВЕ и выделенных через 45 ч после заражения, или ядерную (цитоплазматическую или мембранную) фракцию (4) из не зараженных вирусом клеток

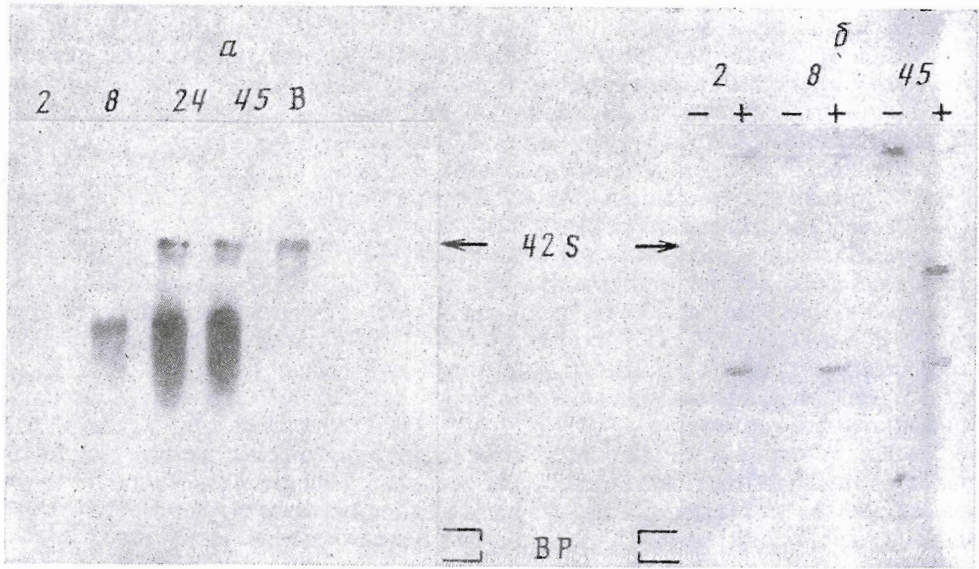
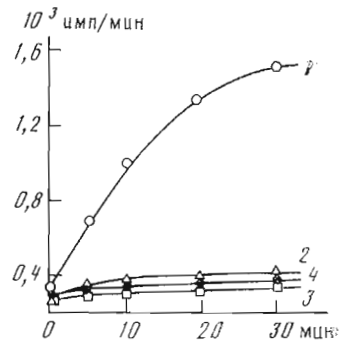


Рис. 2. Радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов синтеза РНК ТВЕ *in vivo* (а) и *in vitro* (б). Условия см. в «Экспер. части». Плюс или минус означает добавление в реакционную смесь или отсутствие в ней нерадиоактивных препаратов 4NTP при синтезе РНК. Цифрами указано время постинфекции (а), после которого были получены фракции ядер. ВР — бромфеноловый синий

ядер, обладающей репликативной активностью, существенно не влияет на синтез вирусных РНК, однако необходимость этого белка в синтезе RF-формы РНК на ранних стадиях инфекции не исключается [9].

В настоящей работе нами выделен репликативный комплекс из клеток почки эмбриона свиньи, инфицированных вирусом ТВЕ, в различные сроки постинфекции и предприняты усилия по выяснению его состава с использованием методов аффинной модификации ферментов производными субстратов. Эти методы с успехом используются в исследованиях структур активных центров ряда ферментативных систем [10—15].

Мы выделяли ядерную, цитоплазматическую и мембранную фракции клеток, зараженных ТВЕ, на различных (2, 8, 24, 45 ч) стадиях инфекционного процесса. Выделение субклеточных фракций проводили в соответствии с методами, представленными в работе [7]. В качестве тест-системы анализа активности репликативного комплекса в субклеточных фракциях мы использовали осаждение нуклеиновых кислот с помощью трихлоруксусной кислоты. Результаты анализа синтеза РНК во фракциях клеток, зараженных и незараженных вирусом ТВЕ в присутствии субстратов, α -аманитина и актиномицина Д, свидетельствуют (рис. 1), что основная часть активности вирусной репликазы связана с фракцией ядер зараженных клеток.

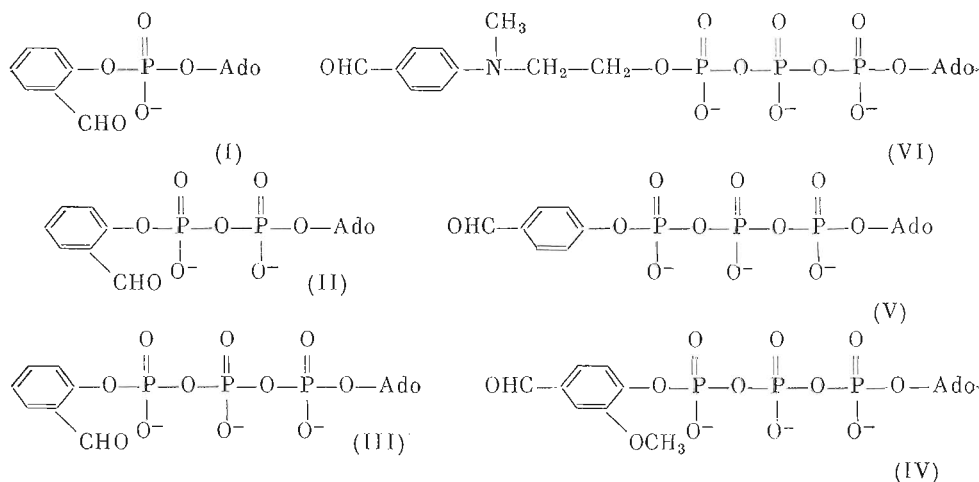
Важной характеристикой репликативного комплекса является его способность синтезировать полноразмерные копии вирусных РНК. Мы анализировали продукты синтеза РНК ТВЕ *in vivo* в зараженных вирусом клетках и *in vitro* в ядерных фракциях, в которых ассоциирован репликативный комплекс. Анализ РНК ТВЕ осуществляли блот-гибридизацией с кДНК ТВЕ после разделения РНК электрофорезом в агарозных гелях в присутствии формальдегида (рис. 2). Суммарную РНК выделяли из суспензии зараженных ТВЕ клеток ($2 \cdot 10^7$ клеток) после 2, 8, 24 и 45 ч инфекции. Из результатов анализа (рис. 2а) видно, что на ранних стадиях инфекции (2 ч) происходит накопление RF-формы РНК ТВЕ (согласно обозначениям форм РНК, принятым для флавивирусов [6—8]). На более поздних стадиях инфекции (24 и 45 ч) наблюдается накопление полноразмерной геномной РНК и гетерогенных по длине РНК-продуктов. Набор РНК ТВЕ в клетках и их последовательное накопление в ходе инфекции подобны тому, что наблюдают при аналогичных анализах продуктов синтеза РНК *in vivo* для вирусов Канжин и Денге [6—8].

Чтобы разграничить синтез РНК ТВЕ репликативным комплексом *in vitro* от РНК ТВЕ, синтезированной в клетках *in vivo*, мы использовали блот-гибридизацию с помощью синтетических олигонуклеотидов-зондов, комплементарных геномной РНК ТВЕ. Подбирали такую чувствительность метода молекулярной гибридизации, которая позволяла детектировать лишь накопившуюся в ходе синтеза *in vitro* вирус-специфическую РНК, но не выявлять изначально присутствующую РНК ТВЕ в субклеточной фракции (см. дорожки 2(—), 8(—) и 45(—), рис. 2б). Из сравнения результатов анализов РНК ТВЕ на рис. 2а и 2б видно, что в ядерной фракции репликативный комплекс *in vitro* способен синтезировать вирус-специфические РНК полного размера на ранних и поздних стадиях инфекции. Следует отметить, что синтезы каждой из форм РНК ТВЕ на этих стадиях инфекции существенно различаются, поэтому, вероятно, репликативные комплексы ТВЕ на этих стадиях могут различаться своим белковым составом. Далее мы остановились на исследовании репликативного комплекса, выделенного на поздних стадиях инфекции, когда наблюдается синтез геномной (+)-цепи РНК на двухцепочечной RF-форме РНК как матрице.

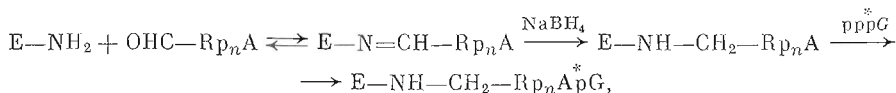
Одна из важных задач исследования репликативного комплекса — выявление состава его белков. Для решения этой задачи может быть использован метод аффинной модификации с помощью реакционноспособных аналогов субстратов, специфически связывающихся с ферментами репликации. Однако традиционная техника аффинной модификации радиоактивно мечеными аффинными реагентами (в случае репликаз — производными нуклеотидов) в нашем случае малоперспективна ввиду наличия неспецифической модификации белков, а также возможного присутствия в ядерной фракции других нуклеотидсвязывающих ферментов. Поэтому мы использовали разработанную ранее технику аффинного мечения, основанную на автокаталитическом введении радиоактивной метки в район активного центра ферментов типа РНК-полимераз [10]. Принцип этого подхода состоит в ковалентном присоединении аналога иницирующего субстрата (аналога NTP, NDP или NMP) и последующей элонгации тех остатков реагента, которые присоединились по участку центра связывания иницирующего субстрата, радиоактивным субстратом (NTP). При этом остатки реагента, связавшиеся на первой стадии вне активного центра, элонгируются не могут, что обеспечивает высокую специфичность введения радиоактивной метки. С помощью этого метода удалось идентифицировать каталитические субъединицы ряда РНК-полимераз прокариот, эукариот, архебактерий, фагов [10—14], а также репликативного комплекса дрожжей [15]. Однако до сих пор не описано случая использования этого метода для идентификации полимераз в сложных смесях.

В качестве аффинных реагентов мы использовали производные АМР, АДР и АТР, а в качестве элонгирующего субстрата — $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$. Такой выбор субстратов был обусловлен тем, что, согласно нашим предвари-

тельными данным, синтез (+)-цепи РНК ТВЕ на RF-форме РНК как матрице начинается с последовательности (5')pppApGrpArpUpCrU. Аффинные реагенты (I)–(VI)



содержали альдегидные группы, способные образовывать основания Шиффа с ϵ -аминогруппами остатков лизина (или с α -аминогруппой N-концевой аминокислоты) в белке. Фракцию ядер клеток СПЭВ, инфицированных вирусом ТВЕ, инкубировали с аффинными реагентами; для повышения прочности ковалентной связи аналога с белком проводили восстановление боргидридом натрия. Затем к смеси добавляли [α - 32 P]GTP. Последовательность реакций, описывающих процесс мечения, можно представить следующей схемой:



где R — остаток реагента (I)–(VI), а n равно 1, 2 или 3. После окончания мечения белки денатурировали прогреванием в присутствии SDS и β -меркаптоэтанола и разделяли диск-электрофорезом в буферной системе Лэммли [16].

В случае использования реагентов (II)–(V) наблюдаются радиоактивные полосы, соответствующие белку с молекулярной массой около 69 кДа (рис. 3, 3–7). Меченый продукт устойчив к действию ДНКазы I и РНКазы A, но разрушается после обработки смеси перед электрофорезом проназой E (рис. 4, 2–4), что говорит о белковой природе вещества, подвергающегося аффинному мечению. Радиоактивного мечения не наблюдается в случае использования АТР вместо реагента (рис. 3, 1) или при замене [α - 32 P]GTP на радиоактивные препараты UTP, CTP или ATP. Это свидетельствует о высокой специфичности введения метки по активному центру в соответствии с описанной выше схемой, включающей в себя автокаталитическую элонгацию. О селективности мечения свидетельствует также включение радиоактивности только в один белок ядерной фракции клеток, содержащей десятки различных полипептидов. Добавление в смесь АТР на стадии инкубации с аналогом приводит к снижению уровня мечения; следовательно, мечение происходит по центру связывания АТР. Метки не наблюдается в том случае, когда не проводится восстановление боргидридом. Это указывает на то, что ковалентное присоединение реагента происходит через стадию образования основания Шиффа, которая является обратимой и не выдерживает условий процедуры электрофореза.

На рис. 4а (дорожки 5–7) представлены результаты аффинного мечения при различных концентрациях реагента (IV). Просчет радиоактивности полос геля в участках мечения продукта с молекулярной массой 69 кДа показывает, что максимальный уровень мечения достигается при

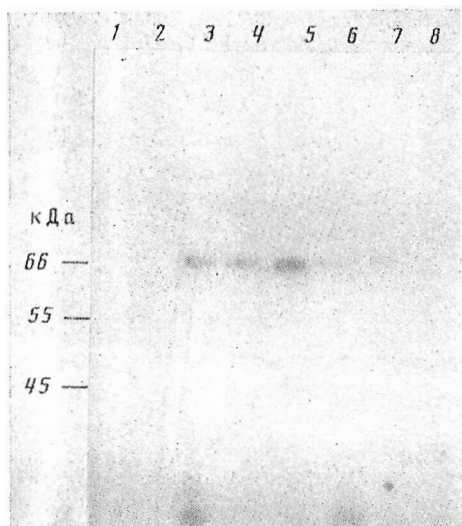


Рис. 3

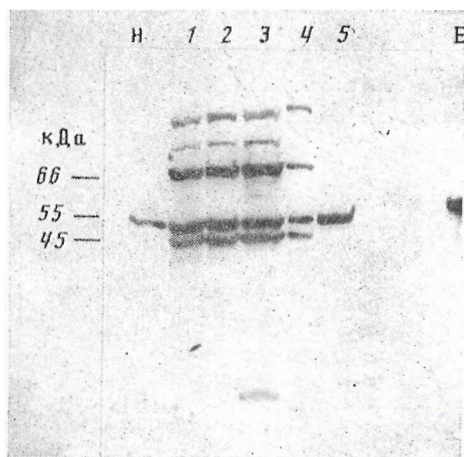


Рис. 5

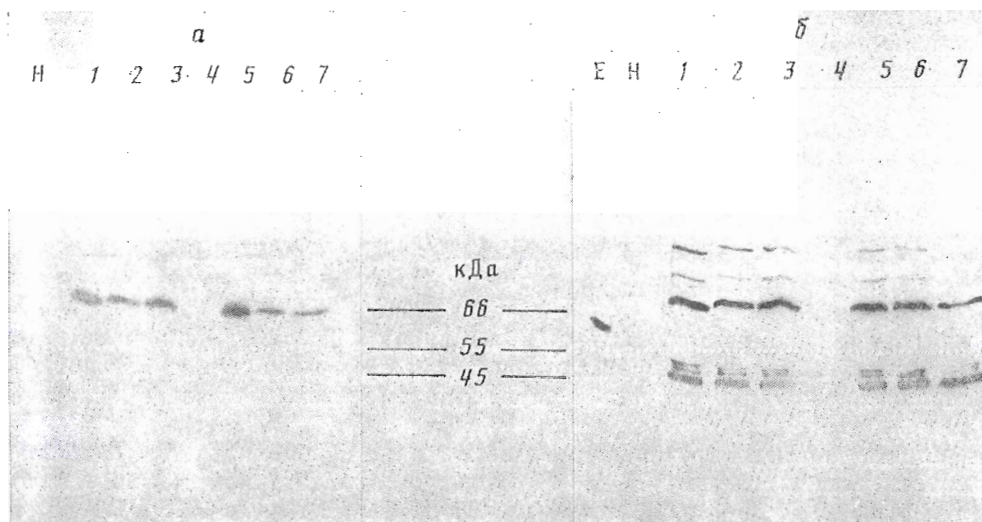


Рис. 4

Рис. 3. Радиоавтограф разделения продуктов аффинного мечения в 7,5% ПААГ. Эксперименты выполнены с фракцией ядер клеток СПЭВ, не инфицированных (дорожка 8) или инфицированных в течение 45 ч вирусом ТВЕ (1—7). К препаратам ядер добавляли компоненты буфера (см. «Экспер. часть») и реагент в концентрации 10^{-3} М: 1 — АТР; 2 — *o*-формилфениловый эфир АМР; 3 — *o*-формилфениловый эфир АРР; 4, 8 — *o*-формилфениловый эфир АТР; 5 — *o*-метокси-*n*-формилфениловый эфир АТР; 6 — *n*-формилфениловый эфир АТР; 7 — 4-[N-метил-N-2-(аденозин-5'-трифосфорил)этиламмино]бензальдегид. Смеси инкубировали с реагентами, добавляли NaBH_4 и радиоактивный второй субстрат. Продукты модификации анализировали в пластине ($8 \times 10 \times 0,2$ см) 7,5% ПААГ

Рис. 4. Радиоавтограф (а) и иммуноблот (б) продуктов аффинного мечения. Аффинную модификацию проводили с фракцией ядер (1—7), инфицированных вирусом ТВЕ клеток СПЭВ (45 ч постинфекции) и из неинфицированных клеток (дорожка Н). В реакционную смесь добавляли *o*-формилфениловый эфир АТР в концентрации 10^{-5} М (дорожки Н, 1—5), 10^{-4} М (6) и 10^{-3} М (7). После модификации и последующей элонгации остатка реагента с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ в пробу 2 добавляли ДНКазу I, в пробу 3 — РНКазу А, в пробу 4 — проназу Е и смеси инкубировали 1 ч при 37°C . Подготовку образцов для разделения в геле, электрофорез в 10% ПААГ, электроперенос образцов на нитроцеллюлозный фильтр и радиоавтографию проводили как описано в «Экспер. части». Обработка нитроцеллюлозного фильтра, связывание белков с антителами из ацетинной жидкости, проявление с помощью конъюгата описаны в «Экспер. части». Время проявления с помощью конъюгата составляло 3 мин. Все обозначения на рис. 4б даны в соответствии с обозначениями, представленными на рис. 4а; дорожка Е — препарат белка оболочки Е (36 нг) вируса ТВЕ

концентрации реагента 10^{-5} М, при более низких и более высоких концентрациях уровень мечения снижается. Понижение уровня мечения продукта модификации при высоких концентрациях реагента несколько необычно, но может быть связано с инактивацией фермента за счет высокого уровня неспецифической модификации остатков лизина, находящихся на поверхности фермента.

На следующем этапе исследования необходимо было выяснить природу белка, подвергающегося мечению. Как видно из рис. 4а (дорожка Н), мечения не происходит в случае использования фракции ядер из клеток, не зараженных вирусом ТВЕ. Следовательно, продукт аффинного мечения является вирус-опосредованным материалом. Согласно данным структуры генома вируса, локализации генов на геноме и белков на полипротеине [5], единственный белковый продукт, обладающий массой, близкой к 69 кДа, — это неструктурный белок NS3 (M 68 949 Да). Он обнаруживается в составе ядерной фракции клеток, способной синтезировать РНК при инфекциях вирусом Западного Нила [9].

Чтобы убедиться в правомочности этого утверждения, мы применили гипериммунную мышиную асцитную жидкость для выявления вирусных белков в препаратах ядер, используемых в экспериментах по аффинному мечению в составе репликативного комплекса. Антитела из асцитной жидкости были получены А. С. Каравановым (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, Москва) при иммунизации мыши лизатом клеток мозга мыши, инфицированной вирусом ТВЕ. Предварительно мы анализировали специфичность антител из асцита мыши в отношении препаратов белков из субклеточных фракций и из клеток СПЭВ (рис. 5). Видно, что гипериммунная асцитная жидкость способна выявлять вирусспецифические белки в зараженных вирусом ТВЕ клетках и в их субклеточных фракциях. В используемой нами мышиную асцитной жидкости присутствует фракция иммуноглобулинов, способная связываться с белком незараженных клеток (клеточный белок, обладающий подвижностью, сходной с подвижностью белка оболочки Е вируса ТВЕ; дорожка Н, рис. 5). Из результатов иммунного тестирования белков (рис. 5) видно, что фракция ядер отличается от фракции цитоплазмы, мембран и суммарного лизата клеток наличием низкомолекулярного вирусспецифического белка.

Результаты выявления вирусных белков с помощью антител из мышинного асцита во фракциях ядер инфицированных клеток при аффинном мечении репликативного комплекса представлены на рис. 4б. Наряду с другими вирусспецифическими белками белок р69, аффинно модифицирующийся с помощью аналогов АТФ, способен специфично связываться с антителами из асцитной жидкости.

Совокупность результатов иммунного тестирования и аффинного мечения белков аналогами субстратов в репликативном комплексе из ядер позволяет заключить, что на поздних стадиях инфекции клеток вирусом ТВЕ в состав репликативного комплекса входит белок р69 (NS3), по-видимому, участвующий в инициации синтеза вирусной РНК.

Рис. 5. Иммуноблот препаратов белка лизата клеток СПЭВ и субклеточных фракций. К субклеточной фракции или клеткам СПЭВ добавляли SDS, β -меркаптоэтанол, глицерин и бромфеноловый синий. Пробы прогревали 3 мин при 100° С и проводили электрофорез в пластине ($8 \times 10 \times 0,2$ см) 10% ПААГ. Дорожка 1 — лизат клеток СПЭВ (10^6 клеток); 2 — лизат клеток после 24 ч инфекции вирусом ТВЕ (10^6 клеток); 3 — лизат клеток после 45 ч инфекции вирусом ТВЕ (10^6 клеток); 4 — 10 мкл ядерной фракции; 5 — 10 мкл мембранной фракции; 6 — 10 мкл цитоплазматической фракции. Ядерная, мембранная и цитоплазматическая фракция выделены из клеток СПЭВ после 45 ч инфекции вирусом. Дорожка Е — 36 нг белка оболочки Е вируса ТВЕ. Электроперенос белков из геля, связывание их с антителами из мышинного асцита и проявление комплексов антител с белками (время проявления 30 мин) проводили как описано в «Экспер. части»

Экспериментальная часть

В работе использованы препараты NTP и dNTP, актиномицин D, α -аманитин, панкреатическая дезоксирибонуклеаза (ДНКаза I), рибонуклеаза А (РНКаза А) (Sigma, США), [α - 32 P]NTP и [α - 32 P]dNTP, [γ - 32 P]ATP с удельной активностью 3000 Ки/ммоль (Изотоп, СССР), проназа Е (Merck, ФРГ).

Очищенный препарат вируса ТВЕ (штамм Софбин) и его белок Е оболочки были выделены С. Г. Рубиным (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, Москва) и Е. К. Прессманом (НИВХ СО АН СССР). РНК из очищенных вирионов ТВЕ выделяли фенольной депротенинизацией с последующей очисткой центрифугированием в градиенте сахарозы [5].

Выделение субклеточных фракций. Монослой клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ выращивали на среде 199 и проводили заражение вирусом клещевого энцефалита (штамм Софбин) с множественностью инфекции, равной 30. Экстракты из клеток готовили по методу [8], останавливая рост клеток через 2, 8, 24 и 45 ч после заражения. Клетки промывали буфером А (10 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂) 5 раз и гомогенизировали в этом буфере (2·10⁷ клеток/мл) на льду с помощью гомогенизатора Даунса. Ядра клеток отделяли центрифугированием при 700 g (10 мин, 0° С), ресуспендировали в буфере А из расчета 10⁸ клеток/мл и хранили при -70° С. Супернатант, содержащий цитоплазматические компоненты клеток и мембраны, повторно центрифугировали при 20 000 g (30 мин, 0° С) для отделения мембранных структур. Надосадочную жидкость (цитоплазматическая фракция) собирали и хранили при -70° С. Осадок клеточных мембран ресуспендировали в 1 мл буфера А. Концентрация белков в субклеточных фракциях составляла 10—20 мг/мл. Аналогично получали субклеточные фракции из незараженных клеток СПЭВ.

Выделение и анализ РНК ТВЕ из зараженных клеток СПЭВ. Суммарную РНК из зараженных вирусом клеток выделяли через 2, 8, 24 или 45 ч после инфекции. 1 мл зараженных ТВЕ клеток (2·10⁷ клеток/мл) разрушали в гомогенизаторе Даунса, добавляли EDTA до концентрации 1 мМ, SDS — до концентрации 0,1%, ацетат натрия — до 0,01 М, рН 5,0. Затем к смеси добавляли равный объем фенола и инкубировали 15 мин при 65° С. Пробу охлаждали и центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин на центрифуге 5414 (Erppendorf, ФРГ). Водную фазу отделяли и проводили повторную депротенинизацию. К водной фазе добавляли ацетат натрия до концентрации 0,1 М и РНК осаждали этанолом при -50° С в течение ночи. Осадок собирали центрифугированием, растворяли в 15 мкл 70% формамида с 0,02% бромфеноловым синим. Пробу прогревали 3 мин при 65° С и наносили на пластины (10 × 10 × 0,5 см) 4% агарозного геля. Электрофорез осуществляли в буфере, содержащем 2,2 М формальдегид и 20 мМ NaH₂PO₄, рН 7,0. Образцы РНК из геля на нитроцеллюлозные фильтры BA-85 (Schleicher und Schüll, ФРГ) переносили под действием электрического тока на аппарате Transphor (LKB, Швеция). Блот-гибридизацию проводили в течение 10 ч при 65° С в 6 × × SSC в условиях, описанных в работе [5]. В качестве зондов использовали кДНК-вставки плазмид р1, р2, р7 и р10 [5]. Ник-трансляцию кДНК-фрагментов из этих плазмид выполняли с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (НПО «Фермент»), dCTP, TTP, dGTP, [α - 32 P]dATP. Удельная активность кДНК-фрагментов составляла 3·10⁸ имп/мин на 1 мкг. Нитроцеллюлозный фильтр экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1 («Свема», СССР) в течение 40 ч.

Синтез и анализ РНК ТВЕ in vitro. Реакционная смесь (50 мкл) содержала 25 мкл субклеточной фракции, 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ NaCl, 10 мМ β -меркаптоэтанол, АТФ, СТР и УТР (0,5 мМ каждый), 50 мкМ GTP, 5 мкКи [α - 32 P]GTP, 10 мкг/мл актиномицина D, 20 мкг/мл α -аманитина. Синтез РНК проводили при 37° С, отбирая аликваты по 10 мкл в 0, 5, 10, 20, 30 мин. Реакцию останавливали добавле-

нием EDTA до концентрации 20 мМ, пробы осаждали на фильтрах GF/C (Whatman, Англия) 5% трихлоруксусной кислотой при 0° С. Затем пробы промывали, просчет радиоактивности осуществляли на счетчике Rack-Beta (ЛКВ, Швеция).

В случае анализа продуктов синтеза РНК с помощью электрофореза в пластинах (10 × 10 × 0,5 см) 1% агарозного геля в реакционной смеси присутствовали все указанные выше компоненты; кроме того, использовался нерадиоактивный препарат GTP в концентрации 0,5 мМ. Время реакции составляло 30 мин. Разделение продуктов синтеза РНК в присутствии ядерной фракции из зараженных вирусом клеток проводили как описано выше. Блот-гибридизацию осуществляли с помощью синтетических олигонуклеотидов: [5'-³²P]CCTTGTCCCTAGCACCAGC, [5'-³²P]TCCSSAAGAACGTGCAGG, комплементарных РНК ТВЕ на участках 4322—4341 и 7015—7032 в последовательности, представленной в работе [5]. Удельная активность зонда составляла 10⁷ имп/мин/мкг. Гибридизацию проводили при 55° С в 6 × SSC в течение 10 ч при концентрации зонда 10 нг/мл. Нитроцеллюлозный фильтр экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1 в течение 20 ч.

Реакционноспособные аналоги аденозин-5'-три(ди-, моно-)фосфатов. Синтез, очистку и анализ *o*-формилфениловых эфиров AMP, ADP, ATP, *p*-формилфенилового и *o*-метокси-*p*-формилфенилового эфиров ATP, 4-[*N*-метил-*N*-2-(аденозин-5'-трифосфорил)этиламино]бензальдегид проводили как описано ранее в работах [10, 13, 17, 18].

Аффинное мечение репликативного комплекса. К репликативному комплексу ТВЕ (14 мкл ядерной фракции) добавляли трис-HCl, pH 8,0, до концентрации 50 мМ, MgCl₂ до 10 мМ, β-меркаптоэтанол до 10 мМ, NaCl до 50 мМ и один из реагентов (или ATP) до концентрации 10⁻³ М либо в концентрации, указанной в подписях к рисункам. Реакционную смесь (20 мкл) инкубировали 15 мин при 37° С, в смесь вводили NaBH₄ до концентрации 0,01 М и инкубировали еще 15 мин при 30° С. Затем добавляли [α-³²P]GTP (3000 Ки/ммоль) до концентрации 10⁻⁶ М. Смесь выдерживали 15 мин при 30° С. Белки денатурировали прогреванием реакционной смеси при 100° С в течение 3 мин в присутствии 1% SDS, 1% β-меркаптоэтанола, 5% глицерина и 0,02% бромфенолового синего. Анализ продуктов модификации осуществляли электрофорезом в денатурирующих условиях [16] в 7,5% ПААГ с последующей радиоавтографией на рентгеновскую пленку в течение 48 ч. Перенос белков на нитроцеллюлозные мембраны BA-85 осуществляли по методу [19]. В тех случаях, когда продукты модификации подвергались дополнительной обработке, в пробы перед денатурацией белков добавляли либо проназу Е (до 50 мкг/мл), либо ДНКазу I (до 200 мкг/мл), либо РНКазу А (до 200 мкг/мл). Затем реакционную смесь инкубировали 1 ч при 37° С; компоненты смеси денатурировали и разделяли электрофорезом. В качестве маркерных белков при электрофорезе использовали препараты альбумина (*M* 66 000 Да), яичного альбумина (*M* 45 000 Да) (препараты фирмы Sigma, США) и белок оболочки Е вируса ТВЕ (гликопротеин с *M* 55 000 Да [20]). Полосу геля с маркерными белками отрезали, а затем белки выявляли с помощью красителя кумасси R-250.

Иммуноблоттинг белков. Электроперенос белков после их разделения в ПААГ проводили на нитроцеллюлозные фильтры BA-85 согласно работе [19] на аппарате Transphor (ЛКВ, Швеция) в течение 12 ч, после чего фильтры помещали на 3 ч в буфер Б (20 мМ трис-HCl, pH 7,5, —0,15 М NaCl) с 0,5% желатином. Связывание антител из асцитной жидкости с белками, иммобилизованными на нитроцеллюлозном фильтре, проводили в буфере Б с 0,5% желатином и 0,05% твином-20 в течение 5 ч при разведении асцитной жидкости в 1000 раз. Гипериммунная мышьяная асцитная жидкость, содержащая антитела к белкам вируса ТВЕ, была предоставлена А. С. Каравановым (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, Москва). От избытка антител фильтр отмывали (3 × 50 мл) буфером Б с 0,05% твином-20. Комплексы антител с белками проявляли с помощью конъюгата белок А — пероксидаза хрена (Sigma,

США) и субстрата пероксидазы — 4-хлор-1-нафтол в присутствии H_2O_2 [21].

Авторы выражают благодарность А. С. Караванову за предоставленный препарат гипериммунной асцитной жидкости мыши против белков вируса клещевого энцефалита, С. Г. Рубину и Е. К. Прессману за препараты очищенного вируса и его белка оболочки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rice C. M., Lenches E. M., Eddy S. E., Shin S. J., Sheets R. L., Strauss J. H. // Science. 1985. V. 229. № 4715. P. 726—733.
2. Castle E., Leider U., Nowak T., Wengler G. // Virology. 1986. V. 149. № 1. P. 10—26.
3. Sumiyoshi H., Mori C., Fuke J., Morita K., Kuhara S., Kondou J., Kukushi Y., Nagamatu H., Igarashi A. // Virology. 1987. V. 161. № 2. P. 497—510.
4. Coia G., Parker M. D., Speight G., Byrne M. E., Westaway E. G. // J. Gen. Virol. 1988. V. 69. № 1. P. 1—21.
5. Плетнев А. Г., Ямщиков В. Ф., Блинов В. М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 11. С. 1504—1521.
6. Cleaves G. R., Ryan T. E., Schlesinger R. W. // Virology. 1981. V. 111. № 1. P. 73—83.
7. Chu P. W. G., Westaway E. G. // Virology. 1985. V. 140. № 1. P. 68—79.
8. Chu P. W. G., Westaway E. G. // Virology. 1987. V. 157. № 2. P. 330—337.
9. Grun J. B., Brinton M. A. // J. Virol. 1987. V. 61. № 11. P. 3641—3644.
10. Grachev M. A., Kolocheva T. I., Lukhtanov E. A., Mustaev A. A. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 113—121.
11. Grachev M. A., Hartmann G. R., Maximova T. G., Mustaev A. A., Schöffner A. R., Sieber H., Zaychikov E. F. // FEBS Lett. 1986. V. 200. № 2. P. 287—290.
12. Riva M., Schöffner A. R., Sentenac A., Hartmann G. R., Mustaev A. A., Zaychikov E. F., Grachev M. A. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 30. P. 14377—14380.
13. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Лукханов Е. А., Максимова Т. Г., Мустаев А. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 568—570.
14. Hartmann G. R., Biebricher C., Glaser S. J., Grosse F., Katzameyer M. J., Lindner A. J., Mosig H., Nasheuer H. P., Rothman-Denes L. B., Schöffner A. R., Schneider G. J., Stetler K. O., Thomm M. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1988. V. 369. № 2. P. 775—788.
15. Foiani M., Lindner A. J., Hartmann G. R., Lucchini G., Plevani P. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 4. P. 2189—2194.
16. Laemmli U. L. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
17. Grachev M. A., Lukhtanov E. A., Mustaev A. A., Zaychikov E. F., Abdukayumov M. N., Rabinov I. V., Richter V. I., Skoblov Y. S., Chistyakov P. G. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 180. № 2. P. 577—585.
18. Грачев М. А., Лукханов Е. А., Мустаев А. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1079—1087.
19. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 9. P. 4350—4354.
20. Heinz F. X., Kunz C. // J. Gen. Virol. 1981. V. 57. № 1. P. 263—274.
21. Svank R. T., Munkres K. D. // Anal. Biochem. 1971. V. 39. № 2. P. 462—477.

Поступила в редакцию 7.VI.1989

O. V. MOROZOVA, N. A. BELYAVSKAYA*, E. F. ZAYCHIKOV**, E. A. KVETKOVA*,
A. A. MUSTAEV**, A. G. PLETNEV

TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS REPLICATION COMPLEX.

I. IDENTIFICATION OF A PROTEIN RESPONSIBLE FOR THE INITIATION OF RNA SYNTHESIS IN NUCLEAR-ASSOCIATED FRACTION OF INFECTED CELLS BY MEANS OF AFFINITY LABELLING

Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR;

* Omsk Institute of Natural-Foci Infections, Ministry of Health
of the RSFSR;

** Limnological Institute, Siberian Division of the Academy of Sciences
of the USSR, Irkutsk

The pig embryo kidney cells infected by tick-borne encephalitis virus were fractionated into nuclear-associated, cytoplasmic and membrane fractions. The main part of the virus replicase activity was associated with the nuclei. The replication complex is able to synthesize full-length viral RNAs in vitro. To identify proteins involved in the initiation of the replication at the late stages of the infection, the highly specific affinity labelling technique was used. It was shown that with aldehyde-containing derivatives of ATP, ADP and AMP and $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ the target of labelling is a polypeptide having molecular weight about 69 kDa. The same protein is immunostained with TBE virus specific antibodies after blotting onto nitrocellulose. The conclusion is made that nonstructural protein NS3 takes part in virus replication at the late stage of the infection.